



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 198 54 003 A 1**

⑦① Aktenzeichen: 198 54 003.5
⑦② Anmeldetag: 18. 11. 1998
④③ Offenlegungstag: 25. 5. 2000

⑤ Int. Cl.⁷:
G 01 N 35/00
B 01 L 3/02
G 01 N 35/10
G 01 N 1/10
B 01 L 9/00
B 01 L 3/00
G 01 N 1/28
G 01 F 11/04
// G 01 N 33/53

DE 198 54 003 A 1

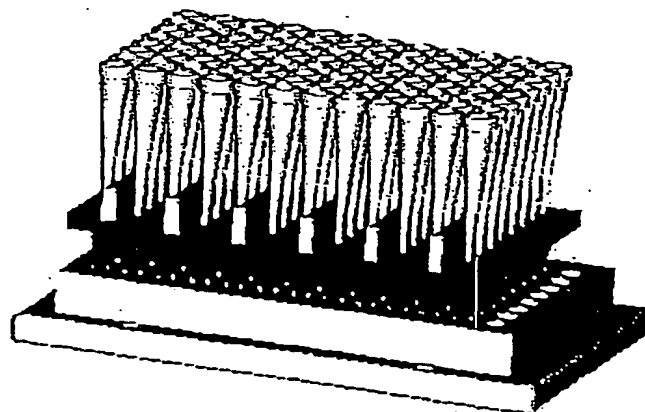
⑦① Anmelder:
JENOPTIK AG, 07743 Jena, DE

⑦② Erfinder:
Moore, Thomas, 07751 Drackendorf, DE;
Zimmermann, Peter, 07747 Jena, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

⑤④ Simultanes Magnetpartikelhandling in zweidimensionaler Anordnung

⑤⑦ Die Erfindung betrifft eine zweidimensionale Anordnung für ein simultanes Magnetpartikelhandling, bestehend aus einer zweidimensionalen Pipettenanordnung, einer zweidimensionalen Magnethalteranordnung und einer zweidimensionalen Kavitätsanordnung in Kombination mit einer Handhabungsmechanik.



DE 198 54 003 A 1

Beschreibung

Umfeld

Seit Ende der 70er Jahre sind Magnetpartikel in der Molekularen Biologie/Biochemie in Gebrauch. Vielfach werden polymerbeschichtete mikroskopisch kleine Sphären, die magnetisches Material in Form von z. B. Eisenoxid enthalten, genutzt, um andere Moleküle an der Oberfläche zu binden und zu transportieren.

Der Vorteil dieser mikroskopisch kleinen Sphären – "Magnetpartikel, magnetic beads" – besteht in der riesigen Oberfläche von nur wenigen Milligramm Material und der einfachen Herstellung von homogenen Partikelsuspensionen, die mit normalen Liquidhandlinggeräten pipettiert, dosiert, dispensiert, diluiert und gemischt werden können. Die Zahl der Anwendungen kann hier nicht vollständig beschrieben werden, sehr weit verbreitet sind u. a.:

- Purifikation von RNA/DNA-Produkten
- mRNA-Isolation
- DNA/RNA Hybridisation
- Festphasensequenzierung
- Zellseparationstechnik

aber auch die üblichen ELISA-Verfahren sind alternativ mit Magnetpartikeln durchführbar, da diese sehr gut mit normalen Laborgeräten gewaschen werden können.

Ein sehr wichtiger Schritt ist auch das Einengen von Suspensionsvolumina, was über die Bindung an Magnetpartikel ebenfalls möglich ist.

Stand der Technik

Zur Trennung der festen und flüssigen Phase sind verschiedene Geräte im Gebrauch. So bietet z. B. die Fa. DYNAL für ein Mikrozentrifugenröhrchen der Fa. Eppendorf eine Halterung an, die das Röhrchen mit einer Feder festhält und gegen einen Permanentmagneten drückt, so daß fast alle Magnetpartikel die sich in Suspension befinden zu diesem hinbewegen.

Mit Hilfe einer normalen Handpipette gelingt es sehr einfach die Flüssigkeit abzunehmen, so daß nur noch die Magnetpartikel an der Gefäßwand verbleiben. Wird das Röhrchen aus der Halterung entnommen und wieder mit Flüssigkeit befüllt und durchmischt, so werden die Partikel gewaschen, so daß letztendlich nur noch das gebundene Produkt an den Partikeln verbleibt. Die Trennung von Produkt und Magnetpartikel erfolgt auf gleichem o. g. Wege. Ebenfalls gebräuchlich sind elektrisch steuerbare Magnetfelder (DYNAL-MPC-auto 96) oder motorisch bewegliche Permanentmagnete; AGOWA-Magnetseparator (DE-GM 296 14 623).

Für das Hantieren von Magnetpartikeln im Mikrotitrationsplattenformat insbesondere zur Vorbereitung der PCR in sog. thin-wall-tube-plates können die Magnethalter MPC-96 oder MPC-9600 von DYNAL verwendet werden. Der Magnetpartikelhalter MPC-9600 ist auch im o. g. AGOWA-Magnetseparator enthalten. Ebenfalls im 8 x 12-well-Format arbeitet der zweiteilige Magnetseparator der Fa. PROMEGA. Eisenstifte tauchen in die Mikrotitrationsplatte und halten die Magnetpartikel fest, so daß die feste Phase an diesen Stiften fixiert wird. Dies funktioniert solange die Eisenstifte mit einem Permanentmagnet gekoppelt sind. Wird dieser entfernt, so können die Magnetpartikel wieder resuspendiert werden. Für die Durchführung von Screeningexperimenten ist es wichtig im Mikrotitrationsplattenformat einen hohen Durchsatz an Testpunkten pro Zeiteinheit zu erreichen. Wie bei allen Liquidhandlingschritten gelingt dies nur

durch eine entsprechende Automatisierung.

Deshalb sind die im Screening sehr weit verbreiteten Pipettiermaschinen wie z. B. von den Firmen TECAN, BECKMAN, HAMILTON und ROSYS mit Magnetseparatoren von den Firmen AGOWA bzw. DYNAL nachgerüstet worden. Komplette Testabläufe (z. B. mRNA-Isolierung aus der Zellkultur oder virale RNA aus Vollblut für PCR-Nachweis) dauern aber mit diesen Geräten immer noch mehrere Stunden. Charakteristisch für diese Maschinen ist, daß sie die Liquidhandlingschritte mit einer Pipettenspitze oder eindimensional aufgereihten 2 bis 8 Pipettenspitzen durchführen.

Es ist deshalb Aufgabe der Erfindung eine automatisierbare Lösung für höheren Durchsatz an Mikrotitrationsplatten pro Zeiteinheit vorzuschlagen.

Eine solche Durchsatzsteigerung gelingt durch die Kombination der an sich bekannten mikrotitrationsplattenkompatiblen Magnethalteranordnungen und den ebenfalls bekannten Simultandosierern mit 8 x 12-well Spitzen im Mikrotitrationsplattenformat mit einer entsprechend gestalteten Mikrotitrationsplatten- und Magnethalterpräsentiermechanik.

Durch die Anwendung dieser jeweils zweidimensionalen Liquid- und Magnetpartikelhandlinkeinrichtungen entsteht unter Hinzunahme von entsprechend gestaltetem Plattenhandling ein völlig neues Werkzeug für Isolation/Purifikation im Minutenmaßstab.

Im folgenden soll die Gerätetechnik hierzu mit beispielsweise genannten Mitteln beschrieben werden:

Simultandosierer (DD-PS 260571)

Diese Geräte ermöglichen die gleichzeitige Aufnahme/Abgabe von Flüssigkeiten im für Mikrotitrationsplatten üblichen zweidimensionalen 8 x 12- oder 16 x 24-well Raster durch Pipettenspitzen, Nadeln oder ähnlichen Einrichtungen.

Magnethalter

Zweidimensionale 8 x 13-Lochanordnung im Mikrotitrationsplattenformat die z. B. die wells von sogenannten thin wall tube plates aufnehmen können und zwischen deren Lochspalten oder Lochzeilen Permanentmagnete so angeordnet sind, daß beim Einsetzen von den o. g. Platten die in den wells der Platten befindlichen Magnetpartikel von diesen Magneten angezogen und an der Wand der wells fixiert werden. Durch eine zusätzliche Spalte oder Zeile auf dieser Lochplatte gelingt es leicht durch Umsetzen der thin wall tube plates die Magnetpartikel jeweils rechts oder links an die wells zu heften. Durch Wechsel der Position können die Partikel in der flüssigen Phase gewaschen werden. Im folgenden Beispiel wird von einer zusätzlichen Spalte ausgegangen,

oder eine zeilen- oder spaltenweise orientierte Kammanordnung von Permanentmagnetstäben deren Abstand eine Positionierung zwischen den Pipettenspitzen des Simultandosierers erlaubt. Damit ist es möglich die Magnetpartikel in der Pipettenspitze zu halten und Flüssigkeit aufzunehmen oder abzugeben.

Thin wall tube plates (TWP)

Spezielle 8 x 12 = 96 well-Mikrotitrationsplatten (auch 192 und 384 well üblich) geringer Wandstärke üblicherweise aus PP oder PC, welche gewöhnlich so dimensioniert sind, daß sie in marktüblichen Thermocyclern benutzt werden, und somit die Gelegenheit bieten, ebenfalls in einer

Lochplatte mit Magneten positioniert zu werden.

Mikrotitrationsplatten- und Magnethalterhandhabungsmechanik

Vorrichtung zur relativen Positionierung von Mikrotitrationsplatten (MTP), TWP's und Vorrats- und Waschgefäßen gegenüber einem Magnethalter sowie wiederum des Magnethalters gegenüber einer matrixförmigen zweidimensionalen Pipettenspitzenanordnung, derart daß es möglich ist z. B. TWP's in den Magnethalter wechselweise beginnend mit Spalte 1 oder 2 abzulegen oder einen Magnethalter gegenüber den Pipettenspitzen zu positionieren, daß in einer ersten Variante Mittel vorgesehen sind, die TWP's oder andere Gefäße mit mikrotitrationsplattenartiger Geometrie von einer Transporteinrichtung zu übernehmen und auf dem Magnethalter abzusetzen und diesen gegenüber den Pipettenspitzen so zu positionieren, daß mit einer matrixförmigen Pipettenspitzenanordnung ein Flüssigkeitsaustausch zwischen Spitzen und Kavitäten erfolgen kann.

Oder das in einer zweiten Variante ein Magnetkamm zwischen den Spitzen so angeordnet wird, daß der Magnetkamm wechselweise beginnend in der ersten oder zweiten Spitzenreihe beginnend angeordnet wird und das ein Flüssigkeitsaustausch zwischen Pipettenspitzen und den Kavitäten der Mikrotitrationsplatte möglich ist.

Die Mittel zur Lösung dieser technischen Aufgabe lassen sich wie folgt beschreiben:

Zur Bewegung der Mikrotitrationsplatten und des Magnethalters in vertikaler Richtung ist ein entsprechender motorischer Antrieb z. B. in Form eines Zahnstangenantriebs mit Schrittmotor vorgesehen. Die Positionierung in beiden horizontalen Richtungen erfolgt mit einem elektrisch steuerbaren Kreuztisch. Die Fixierung der Platten unterhalb der Pipettenspitzen kann mit einem Greifmechanismus erfolgen. Der Transport der Platten zum Simultandosierer erfolgt durch einen Wagen z. B. auf einer Stangenführung. Um die Magnethalter zwischen den Pipettenspitzen zu bewegen ist ein horizontal laufender linearer Antrieb vorgesehen der die Magnete aus dem Zwischenraum der Spitzen herauszieht und in einer um ein Raster versetzten Position wieder hineinschiebt. Für alle diese Antriebs- und Handhabungsmittel kann auf den Stand der Technik zurückgegriffen werden. Es ist einfach möglich mit einer Computersteuerung diese verschiedenen Bewegungsabläufe zu automatisieren.

Ein einfacher Ablauf zum Waschen der Partikel ist im folgenden beschrieben:

Die Partikel befinden sich in homogener Suspension in einer TWP und haben an ihrer Oberfläche z. B. Nukleinsäure gebunden. Durch Einsetzen der thin wall plates in den Magnetadapter werden die Partikel an den Wänden der wells fixiert, und es gelingt mit der zweidimensionalen Pipettenanordnung die flüssige Phase abzunehmen und simultan Waschlösungen aus einem Vorratsgefäß, welches u. a. auch eine MTP oder ein ähnliches Gefäß sein kann, zuzugeben. Durch Wechseln der Plattenposition um eine Spalte gegenüber den Magneten bewegen sich die Partikel von einer well-Seite zur anderen und werden gewaschen. Dieser Vorgang kann außerhalb des Magnethalters ergänzt werden, durch das simultane Aufsaugen/Abgeben der Flüssigkeit einschließlich der Partikel mit der zweidimensionalen Pipettenspitzenanordnung.

Die Arbeit mit einer solchen Anordnung führt zu einer deutlichen Erhöhung der Verarbeitungsgeschwindigkeit, so daß es möglich wird die Aufreinigung von Nukleinsäuren, einschließlich von Reagenzzugaben, Lyse, Elution und Hinzufügung des PCR-Mixes innerhalb von wenigen Minuten durchzuführen.

Patentansprüche

1. Anordnung für Liquid-, Magnetpartikel- und Gefäßhandling **dadurch gekennzeichnet**, daß diese eine zweidimensionale Pipettenanordnung, eine zweidimensionale Magnethalteranordnung und eine zweidimensionale Kavitätenanordnung in Kombination mit einer Handhabungsmechanik aufweist.
2. Anordnung gemäß 1, dadurch gekennzeichnet, daß die zweidimensionale Pipettenanordnung ein simultan arbeitender Pipettier-/Dosierautomat mit wenigstens 4 Spitzen/Nadeln ist.
- 3.1 Anordnung gemäß 1, dadurch gekennzeichnet, daß die zweidimensionale Magnethalteranordnung eine Trägerplatte für eine Vielzahl von matrixartig angeordneten Permanentmagneten ist.
- 3.2 Anordnung gemäß 1, dadurch gekennzeichnet, daß die zweidimensionale Magnethalteranordnung eine Trägerplatte für eine Vielzahl von zeilenweise angeordneten Permanentmagnetstäben ist.
- 3.3 Anordnung gemäß 1, dadurch gekennzeichnet, daß die zweidimensionale Magnethalteranordnung eine Trägerplatte für eine Vielzahl von spaltenweise angeordneten Permanentmagnetstäben ist.
4. Anordnung gemäß 1, dadurch gekennzeichnet, daß die zweidimensionale Magnethalteranordnung eine kammarartige Anordnung von Permanentmagnetstäben ist.
5. Anordnung gemäß 1, dadurch gekennzeichnet, daß die zweidimensionale Kavitätenanordnung sich am Mikrotitrationsplattenformat orientiert.
6. Anordnung gemäß 2, dadurch gekennzeichnet, daß die geometrische Anordnung der Spitzen/Nadeln dem Mikrotitrationsplattenformat folgt.
7. Anordnung gemäß 3.1, dadurch gekennzeichnet, daß sich die Anordnung der Permanentmagnete an den Kavitäten der Mikrotitrationsplatten orientiert.
8. Anordnung gemäß 4, dadurch gekennzeichnet, daß sich das Raster der Kammanordnung aus dem Spitzenraster des Simultandosierers ergibt, so daß die Magnetstäbe in die Zwischenräume der Spitzen passen.

Hierzu 2 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -

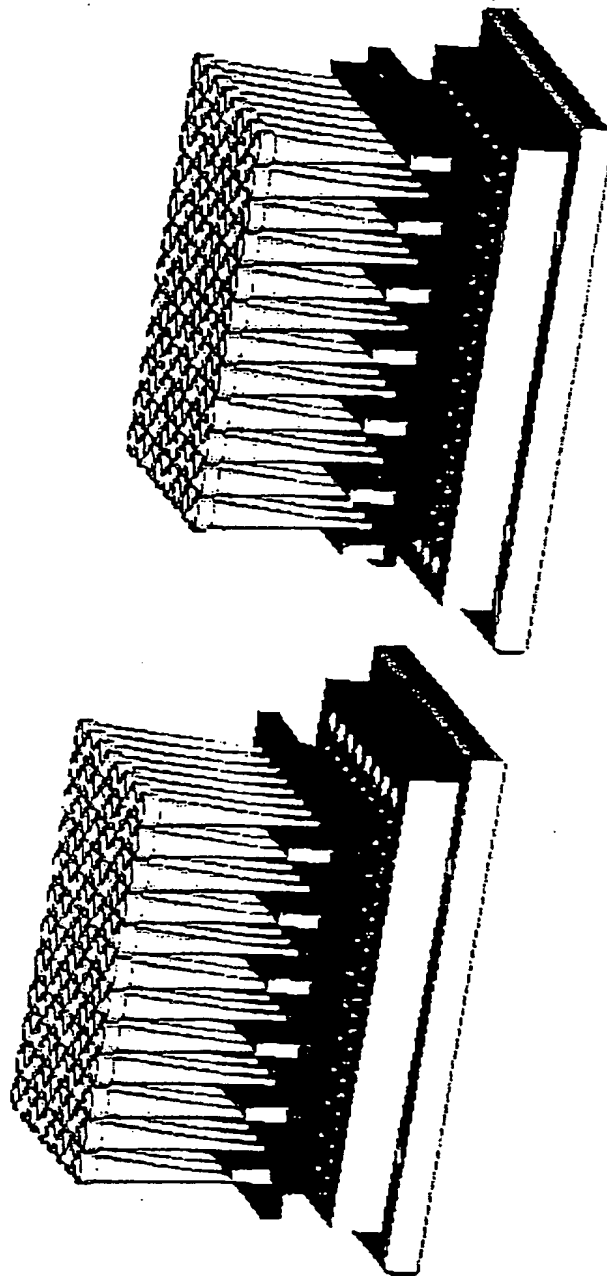


Fig. 1

Fig. 2

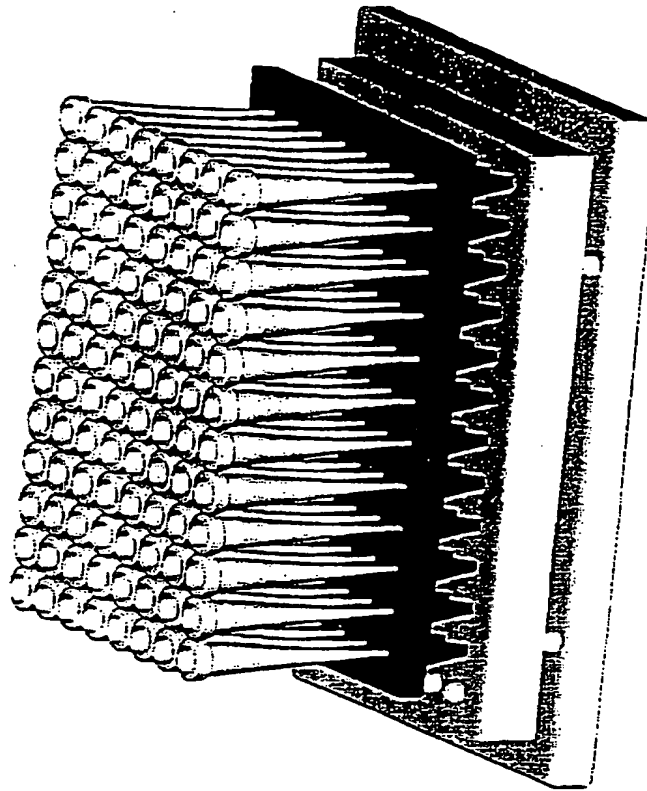


Fig. 4

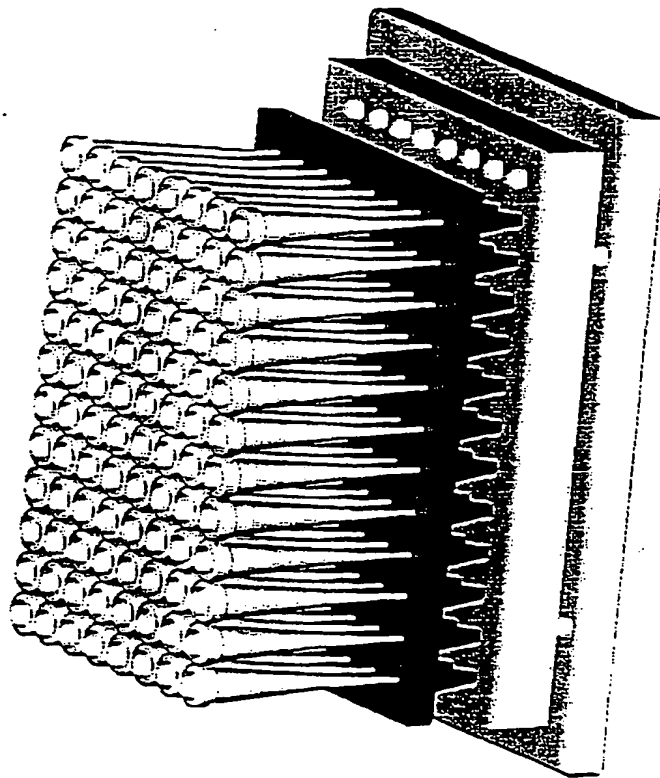


Fig. 3